

کارآیی فرمولاسیون EC عصاره اوکالیپتوس در کنترل بیماری لکه موجی سیب‌زمینی ناشی از قارچ *Alternaria alternata* در شرایط گلخانه

Efficacy of EC Formulation of Eucalyptus Extract in Controlling *Alternaria* Leaf Spot of Potato (*Alternaria alternata*) Under Greenhouse Condition

مسعود ذاکر^{۱*} و بابک حیدری علیزاده^۲

دریافت: ۱۳۹۳/۷/۲۰

پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۱۰

چکیده

عصاره برگ گیاه اوکالیپتوس (*Eucalyptus camaldulensis*) دارای ماده موثره اوکالیپتول است که خاصیت ضد عفونی کننده و قارچ‌کشی دارد. تجزیه سریع آن در طبیعت و سمیت ناچیز آن برای پستانداران باعث گردیده تا استفاده از آن به عنوان آفت‌کشی کم خطر مورد توجه قرار گیرد. تأثیر قارچ‌کشی عصاره اوکالیپتوس در جلوگیری از رشد و جوانه‌زنی قارچ *Alternaria alternata*، عامل بیماری لکه موجی سیب‌زمینی در شرایط آزمایشگاهی به اثبات رسیده است. در این تحقیق کارایی نسبت‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ درصدی فرمولاسیون EC اوکالیپتوس در کنترل بیماری لکه موجی سیب‌زمینی در شرایط گلخانه در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تیمار و چهار تکرار در سال ۱۳۹۰ مورد بررسی قرار گرفت. از قارچ‌کش مانکوزب برای مقایسه بهتر به عنوان شاهد مثبت استفاده شد. نتایج نشان داد که تیمارهای ۵، ۱۰ و ۱۵ درصدی این فرمولاسیون به ترتیب با ۸۰/۲۴، ۱۶/۲۸ و ۹/۲۹٪ وقوع بیماری با شاهد (۳۴/۷۷٪) در سطح احتمال یک درصد دارای اختلاف معنی‌دار بودند و تیمار ۱۵٪ فرمولاسیون اوکالیپتوس با مانکوزب ۰/۲٪ در یک گروه آماری قرار گرفت. با افزایش میزان غلظت فرمولاسیون اوکالیپتوس بر میزان گیاه‌سوزی آن افزوده شد. در تیمارهای ۵، ۱۰ و ۱۵ درصدی فرمولاسیون مورد استفاده به ترتیب ۴/۰۲، ۱۰/۶۵ و ۲۱/۳۴٪ گیاه سوزی مشاهده شد. مطالعات تکمیلی در مورد ایجاد تغییرات در تهیه این فرمولاسیون برای برطرف نمودن نقیصه گیاه‌سوزی آن مورد نیاز است که در آن صورت می‌توان از آن به عنوان قارچ‌کشی بی‌خطر و جایگزینی مناسب برای قارچ‌کش‌های شیمیایی در کنترل بیماری لکه موجی سیب‌زمینی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: بیوفرمولاسیون، اوکالیپتوس، کنترل بیولوژیک، *Alternaria alternata*، سیب‌زمینی

۱- مربی پژوهش بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات کشاورزی شاهرود

۲- استادیار پژوهش، بخش تحقیقات آفت‌کش‌ها، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، تهران

نویسنده مسئول مکاتبات: masoudzaker35@gmail.com

مقدمه

سیبزمینی یکی از محصولات مهم کشاورزی در بسیاری از کشورها از جمله کشور ما می‌باشد. سطح زیر کشت این محصول در استان سمنان بالغ بر ۶۰۰۰ هکتار می‌باشد (احمدی و همکاران، ۱۳۹۴). بیماری لکه موجهی، لکه آلترناریایی یا لکه قهوه‌ای سیبزمینی که توسط گونه‌های *Alternaria solani* (Ellis and Martin) و *A. alternata* (Fe.) Keissl. و Jones and Grouet ایجاد می‌گردد جزء بیماری‌های خسارت‌زای سیبزمینی است که با حمله به قسمت‌های هوایی باعث ایجاد صدمه به این اندام و نهایتاً کاهش محصول می‌گردد (Stevenson et al., 2001). این بیماری جزء آن دسته از بیماری‌های گیاهی است که با تولید انواع توکسین‌ها باعث خشکیدگی بوته‌های سیبزمینی می‌گردد. گونه *A. solani* ممکن است تولید نوعی توکسین به نام آلترناریک اسید نماید ولی بعضی استرین‌های گونه *A. alternata* ممکن است تولید توکسین اختصاصی با نام AL-toxin نمایند (Gilchrist and Grogan, 1975). گونه *A. alternata* که در منابع بیش‌تر با نام عامل بیماری لکه آلترناریایی یا لکه قهوه‌ای سیبزمینی شناخته می‌شود اگرچه به عنوان یک عامل بیماری‌زای ضعیف تلقی می‌گردد و گیاهان ضعیف‌تر را مورد حمله قرار می‌دهد ولی گاهی قادر است گیاهان سالم را نیز مورد هجوم قرار دهد (Rotem, 1994).

بیماری لکه موجهی سیبزمینی همه ساله در مزارع استان سمنان دیده شده و تحقیقات نشان داده است که گونه *A. alternata* عامل اصلی آن در این استان می‌باشد (امتی و کریمی روزبهانی، ۱۳۸۱). از آن‌جاکه محصول اصلی سیبزمینی، غده‌های زیرزمینی می‌باشند، غالباً کشاورزان مگر در حالت اپیدمیکی شدید، اهمیت چندانی به مبارزه با آن نمی‌دهند در حالی که درصد پایین آلودگی اندام‌های هوایی نیز موجب کاهش میزان محصول می‌شود (Droby and Prosky, 1984).

ترکیبات موجود در بسیاری از گیاهان از جمله اوکالیپتوس دارای اثرات آفت‌کشی می‌باشند. استفاده از عصاره این گیاهان که از آن‌ها می‌توان در کنترل آفات و بیماری‌های گیاهی سود جست به سادگی قابل تهیه و کاملاً بی‌خطر بوده، در آلودگی محیط زیست نقشی نداشته و از نظر تعادل اکولوژیکی هیچ‌گونه اختلالی ایجاد نمی‌کنند (Joseph et al., 2008).

عصاره بسیاری از گیاهان حاوی موادی از قبیل آلکالوئیدها، تنین‌ها، کوئینون‌ها، ترکیبات فنولیک و فیتوآلکسین‌ها می‌باشند که خاصیت قارچ‌کشی آن‌ها به اثبات رسیده است (Fawcett and Spencer, 1966). تحقیقات فراوان نشان داده که برخی از عصاره‌های گیاهی و روغن‌های فرار دارای خاصیت قارچ‌کشی بوده و می‌توان از آن‌ها به عنوان جایگزین‌های بی‌خطر با قارچ‌کش‌های شیمیایی در مدیریت بیماری‌های گیاهی استفاده نمود. ژوزف و همکاران (Joseph et al., 2008) طی تحقیقی تأثیر نسبت‌های ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصدی عصاره گیاهان چربیش (*Azardiachta indica*)، آرتمیسیا (*Artemisia annua*)، اوکالیپتوس (*Eucalyptus globulus*)، تولسی (*Ocimum sanctum*) و ریوند چینی (*Rheum emodi*) را در شرایط آزمایشگاهی در کنترل قارچ *Fusarium solani* f. sp. *melongenae* عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی بادمجان مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که عصاره ۲۰ درصدی گیاه چربیش بیش‌ترین تأثیر را در کنترل قارچ عامل این بیماری دارد. در این تحقیق عصاره‌های ریوند چینی، اوکالیپتوس، آرتمیسیا و تولسی در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند. ویلسون و همکاران (Wilson et al., 1997) نشان دادند که روغن‌های فرار گیاه علف لیمو (*Cymbopogon martini*) و چند گیاه دیگر دارای خواص قارچ‌کشی قوی علیه قارچ *Heminthosporium oryzae* می‌باشند. طی تحقیقی با استفاده از عصاره برگ، ساقه، تنه و میوه اوکالیپتوس علیه قارچ‌های خاکزاد فوزاریوم، ریزوکتونیا و ماکروفومیا عوامل پوسیدگی ریشه نخود فرنگی (*Pisum sativum*) و ماش (*Vigna radiata*) نشان داده شد که غلظت ۵ درصدی این عصاره تأثیر مناسبی در کاهش بیماری‌های حاصل از این سه گونه قارچ داشته‌اند (Dawar et al., 2007). در تحقیقی دیگر نشان داده شد که عصاره متانولی سه گونه اوکالیپتوس دارای فعالیت آنتی میکروبی علیه بیست گونه قارچ و شبه قارچ و شش گونه باکتری بیماری‌زای گیاهی مورد آزمایش بودند. در این رابطه گونه‌های شبه قارچ *Pythium* به عصاره استخراج شده از برگ اوکالیپتوس حساس‌تر بود،

به‌خصوص *P. vanterpooli* که به طور کامل به وسیله این عصاره کنترل شد (Hur et al., 2000). ابوالسعود و همکاران (Abo-El-Soud et al., 2005) در مصر طی تحقیقات مفصلی پس از تهیه فرمولاسیون از اسانس‌های روغنی گیاهان رازیانه (*Foeniculum vulgare*)، نعناع فلفلی (*Mentha piperita*)، اوکالیپتوس، زیره سیاه (*Carum carvi*)، شمع‌دانی عطری (*Pelargonium graveolens*) و سنبل‌هندی (*Nardostachys jatamansi*) تأثیر آن‌ها را در رشد تعدادی از قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی از جمله *Fusarium oxysporum*، *Alternaria alternata*، *Penicilium italicum*، *P. digitatum* و *Botrytis cinerea* مورد بررسی قرار دادند. بررسی آن‌ها نشان داد که فرمولاسیون تعدادی از گیاهان از جمله اوکالیپتوس تأثیر به‌سزایی در جلوگیری از رشد پرگنه این قارچ‌ها دارد. عبدالرئوف (Abdel-Raouf, 2001) طی تحقیقی عصاره ۲۰ گیاه را جهت کنترل دو قارچ *Alternaria solani* و *Saprolegnia parasitica* مورد آزمایش قرار داد و گزارش نمود که در این تحقیق عصاره میخک (*Eugenia aromatic*) به‌طور کامل از جوانه‌زنی اسپور قارچ *A. solani* جلوگیری نموده و به‌طور محسوسی باعث کاهش وزن خشک میسلیم در هر دو قارچ گردیده است. در این بررسی عصاره غده‌های سیر، پیاز، عصاره برگ اوکالیپتوس و عصاره میوه فلفل نیز تا حدود زیادی در کنترل هر دو قارچ موثر بودند. استفاده از عصاره پنج گیاه اوکالیپتوس، نعناع فلفلی، داتورا (*Datura stramonium*)، تلخه (*Acroptilon repens*) و لاواند یا استوخودوس (*Lavandula angustifolia*) در جلوگیری از رشد میسلیمی و همچنین جوانه‌زنی اسپور عامل بیماری لکه موجی سیب‌زمینی (*A. alternata*) نشان داد که عصاره‌های متانولی خالص در مقایسه با عصاره‌های استخراج شده با متانول + آب (۱:۱) از کارایی بسیار بالاتری برخوردارند. بر اساس نتایج به‌دست آمده در این تحقیق، عصاره‌های متانولی اوکالیپتوس، نعناع فلفلی، لاواند و قارچ‌کش مانکوزب (۰/۲٪) تأثیر بسیار خوبی در جلوگیری از رشد کلنی و جوانه‌زنی اسپور قارچ مذکور در مقایسه با شاهد در سطح آماری ۱٪ از خود نشان داده‌اند (Zaker and Mosalanejad, 2010).

در تحقیق حاضر غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ درصدی فرمولاسیون EC عصاره اوکالیپتوس *Eucalyptus camaldulensis* جهت کنترل بیماری لکه موجی سیب‌زمینی با عامل *A. alternata* در مقایسه با قارچ‌کش مانکوزب ۲ در هزار مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه فرمولاسیون از عصاره اوکالیپتوس

جهت استخراج ماده موثره اوکالیپتول از اوکالیپتوس، به ازای هر ۱۰۰ گرم از پودر برگ اوکالیپتوس مقدار ۷۰۰ میلی‌لیتر حلال استن استفاده گردید. پودر اوکالیپتوس و حلال در دستگاه استخراج سوکسوله برای مدت ۱۲ ساعت قرار داده شدند تا ماده موثره آن بخوبی استخراج گردد. پس از اتمام استخراج، بالن حاوی محلول عصاره و حلال مذکور به دستگاه روتاری فلش وصل گردید تا حلال به طور کامل از عصاره جدا گردد. عصاره غلیظ شده روغنی در ۵۰۰ میلی‌لیتر حلال اتیل استات حل و به دکانتور یک لیتری انتقال داده شد. سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر آب به آن اضافه و بمدت ۳ دقیقه دو فاز آلی و آبی خوب به هم زده شد. پس از ساکن ماندن دکانتور به مدت کافی دو فاز از یکدیگر جدا گردیدند. محلول آبی از دکانتور جدا گردیده و مجدد به آن ۱۰۰ میلی‌لیتر آب اضافه گردید و طبق همین روش فاز آلی با آب شستشو گردید تا در نهایت فاز آبی از فاز آلی جدا شد. فاز آلی داخل ظرف ارلن حاوی پودر سولفات سدیم به‌مدت یک شبانه روز در دمای محیط آزمایشگاه قرار گرفت. محلول به‌دست آمده به‌وسیله ستون کروماتوگرافی به‌صورت شستشوی سریع در ستون حاوی کربن فعال شستشو گردید. پس از خالص کردن نمونه، حلال آن به‌وسیله کربن فعال خشک گردید و عصاره حاصله بوسیله دو سیستم حلال قطبی و غیر قطبی شامل کلروفرم و هگزان شستشو داده شد. دو نمونه A و B که نمونه اولی حاصل از شستن با حلال غیر قطبی و نمونه دومی با حلال قطبی بود به‌دست آمد. جهت تهیه فرمولاسیون مناسب، از امولسیفایر Tween-85 همراه با عصاره غلیظ شده اوکالیپتوس و روغن مایع طبیعی و حلال زایلن استفاده گردید. روغن، حلال و عصاره داخل ظرف

آزمایشگاهی ریخته و به آن امولسیفایر و آب اضافه شد. محلول هموژنیزه گردیده و در یخچال تا زمان مصرف نگهداری شد. امولسیون آماده شده جهت آزمایشات ته نشینی، شفافیت، لخته‌ای شدن و تیرگی رنگ مورد بررسی قرار گرفت (Erickson, 2007).

تاثیر فرمولاسیون عصاره اوکالیپتوس در کنترل بیماری لکه موجی سیب‌زمینی در شرایط گلخانه

تهیه جدایه بیماری‌زای عامل بیماری

یک جدایه بیماری‌زای *A. alternata*، از کلکسیون بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی مرکز تحقیقات کشاورزی و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی سمنان (شاهرود) که بر اساس کلید شناسایی معتبر (Simmons, 2007) تشخیص داده شده بود، تهیه گردید. جدایه مورد نظر پس از کشت روی PDA برای استفاده در آزمایش در دمای پنج درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تاثیر تیمارها در کنترل بیماری در شرایط گلخانه

نخست غده‌های حدوداً ۵۰ گرمی رقم اگریا ضد عفونی شده با هیپوکلریت سدیم ۱۰٪ در شرایط گلخانه با دمای ۲۰ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد در گلدان‌های پلاستیکی با ابعاد ۲۵×۲۵ سانتی‌متر حاوی ماسه و پیت ماس استریل به نسبت ۱:۱ کشت گردیدند. برای هر تیمار ۴ گلدان و در هر گلدان ۳ غده کشت شد. پس از شروع مرحله گلدهی، با استفاده از محلول سوسپانسیون قارچ با غلظتی معادل $10^5 \times 2$ اسپور در میلی‌لیتر، به صورت مصنوعی بیماری بر روی بوته‌های سیب‌زمینی ایجاد شد. جهت ایجاد آلودگی بهتر قبل از اسپورپاشی از پودر کاربوراند استفاده گردید. سپس بوته‌های سیب‌زمینی مایه‌زنی شده به مدت ۲۴ ساعت در شرایط رطوبتی در زیر کیسه‌های شفاف پلاستیکی قرار گرفتند. پس از برداشتن کیسه‌های پلاستیکی نخستین محلول پاشی‌ها با فرمولاسیون عصاره اوکالیپتوس با سه غلظت (۵، ۱۰ و ۱۵ درصد) و مانکوزب ۲ در هزار با استفاده از اسپری دستی انجام شد و با فاصله ۱۰ روز دومین و سومین محلول پاشی‌ها نیز صورت گرفت. برای محلول پاشی شاهد تنها از آب سترون استفاده شد. دو هفته بعد از آخرین محلول پاشی به طور تصادفی تعداد ۱۰۰ برگ از هر تیمار (۲۵ برگ از هر تکرار) جمع‌آوری و مورد بررسی قرار گرفت.

تعیین درصد وقوع بیماری:

برای تعیین درصد وقوع بیماری در تکرارهای هر تیمار از فرمول زیر استفاده شد (James, 1971).

$$PDI = \frac{nd}{N} \times 100$$

PDI: درصد وقوع بیماری

nd : تعداد برگ‌های دارای علائم بیماری

N: تعداد کل برگ‌های شمارش شده

این تحقیق در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی با ۵ تیمار و ۴ تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم افزار Mstat-C و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن صورت پذیرفت.

نتایج

تهیه فرمولاسیون EC عصاره اوکالیپتوس

فرمولاسیون مورد نظر براساس روش‌های استاندارد و با استفاده از امولسیفایر Tween-85 (۴۸٪)، روغن طبیعی (۴۹٪) و هر کدام از عصاره‌های خالص A و B (۳٪) به صورت مجزا تهیه گردیده و پس از انجام آزمایشات مربوط به پایداری، ته نشینی، شفافیت، لخته‌ای شدن و تیرگی رنگ، برای آزمایش در کنترل بیماری لکه‌موجی سیب‌زمینی در شرایط گلخانه در یخچال نگهداری شد.

کارآیی فرمولاسیون تهیه شده در کنترل بیماری لکه موجی

در این بررسی از محلول ۲ در هزار مانکوزب (شاهد مثبت) صرفاً به عنوان یک قارچ کش شیمیایی موثر علیه این بیماری و برای مقایسه بهتر استفاده گردید. بر اساس نتایج به دست آمده اگرچه قارچ کش مانکوزب در مقایسه با غلظت‌های ۱۵، ۱۰ و ۵ درصدی فرمولاسیون EC اوکالیپتوس دارای تأثیر بهتری در کنترل بیماری بود، ولی تمام تیمارهای فرمولاسیون اوکالیپتوس در کاهش وقوع بیماری در مقایسه با شاهد در سطح آماری ۱٪ دارای اختلاف معنی‌دار بودند (جدول ۱)، خصوصاً تیمار ۱۵ درصدی فرمولاسیون اوکالیپتوس که با مانکوزب ۰/۲ درصد در یک گروه آماری قرار گرفت.

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر تیمارهای مختلف بر بیماری لکه موجی سیب‌زمینی و درصد گیاه‌سوزی آن‌ها در شرایط گلخانه

Table 2. Analysis of variance of effect of different treatments on Alternaria leaf spot of potato and their phytotoxicity percentage under green house condition

منابع تغییرات Source of variation	درجه آزادی df.	مجموع مربعات MS		
		درصد گیاه سوزی Phytotoxicity (%)	درصد وقوع بیماری Disease incidence (%)	
Treatment	تیمار	4	325.724**	535.525**
Error	خطا	15	0.546	5.568
Total	مجموع	19	326.270	542.525
CV	ضریب تغییرات	-	10.26%	12.87%

** معنی‌دار در سطح ۱٪

**Significant at 1% level of significance

در این مطالعه میزان وقوع بیماری در بوته‌های سیب‌زمینی محلول‌پاشی شده با تیمارهای مانکوزب، فرمولاسیون اوکالیپتوس ۱۵، ۱۰ و ۵ درصدی و همچنین شاهد به ترتیب برابر با ۶/۵۲، ۹/۲۹، ۱۶/۲۸، ۲۴/۸۰ و ۳۴/۷۷ درصد تعیین گردید. با افزایش میزان غلظت فرمولاسیون اوکالیپتوس، بر میزان گیاه‌سوزی این فرمولاسیون‌ها افزوده شد. شدت گیاه‌سوزی در بوته‌های سیب‌زمینی تیمارهای ۵، ۱۰ و ۱۵ درصد فرمولاسیون به ترتیب برابر با ۴/۰۲، ۱۰/۶۵ و ۲۴/۳۴ درصد بود (جدول ۲).

جدول ۲- تأثیر تیمارهای مختلف بر بیماری لکه موجی سیب‌زمینی و درصد گیاه‌سوزی آن‌ها در شرایط گلخانه

Table 3. Effect of different treatments on Alternaria leaf spot of potato and their phytotoxicity percentage under green house condition

Treatment	تیمار	درصد گیاه سوزی Percent of phytotoxicity	درصد وقوع بیماری Percent of disease incidence
Mancozeb 0.2%	مانکوزب ۰/۲٪	0.00 d	6.52 d
Eucalypyus formulation 15%	فرمولاسیون اوکالیپتوس ۱۵٪	21.34 a	9.29 cd
Eucalypyus formulation 10%	فرمولاسیون اوکالیپتوس ۱۰٪	10.65 b	16.28 c
Eucalypyus formulation 5%	فرمولاسیون اوکالیپتوس ۵٪	4.00 c	24.80 b
Control (water spray)	شاهد (آب پاشی)	0.00 d	34.77 a

بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن ($p=0.01$) میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون، تفاوت معنی‌داری با هم ندارند. Means followed by similar letters in each column are not significantly different according to Duncan's multiple range test ($p=0.01$).

بحث

ترکیبات موجود در گیاهان به وسیله روش‌های مختلف عصاره‌گیری از گیاه جدا می‌شوند یکی از این روش‌ها، تقطیر می‌باشد که یکی از روش‌های مناسب در جداسازی مواد فرار گیاهی است. در این روش ترکیبات جدا شده به صورت روغن غیر قابل حل در آب درآمده و این روغن به وسیله دکانتور جدا می‌شود (Thejavathi *et al.*, 1995). از دیگر روش‌های معمول استخراج ترکیبات از گیاهان، استفاده از حلال‌های آلی است. در این روش به طور معمول مواد گیاهی در یک حلال آلی برای مدت معین تحت شرایط مناسب برای ترکیبات موجود در گیاه قرار داده می‌شوند. سپس ترکیبات موجود در عصاره بوسیله تبخیر کردن حلال در روتاری جدا شده و باقیمانده به صورت روغن قابل حل در آب به دست می‌آید (Yamazaki *et al.*, 1986). الکل‌ها مانند متانول، اتانول، هیدروکربن‌ها، خصوصاً هگزان، کتون‌ها (استن) و یا هیدروکربن‌های هالوژنه و اتر در این مرحله بکار برده می‌شوند. استفاده از دمای مناسب در جداسازی ترکیبات با حلال‌ها در هر دو روش تقطیر و عصاره‌گیری با حلال بسیار مهم است. بسیاری از ترکیبات فعال موجود در ترکیبات گیاهی در اثر حرارت بالا ممکن است از بین رفته و یا غیرفعال شوند. برای مثال ترکیبات polygodial در اثر حرارت به ایزومر غیر فعال تبدیل می‌شود (Joseph *et al.*, 2008). همچنین این ترکیب می‌تواند در دمای بالا با سایر ترکیبات واکنش نشان دهد. بنابر این استفاده از حلال‌هایی که دارای نقطه جوش پائین هستند مانند هیدروکربن‌های فلوئور، متانول و اتانول برای استخراج ترکیبات گیاهی در حداقل دمای ممکن مناسب می‌باشند (Erickson, 2007). برای ایجاد پایداری و تهیه فرمولاسیون مناسب، موادی از قبیل روغن‌های طبیعی و مواد همراه Tween-85 و Span-85 به عصاره‌ها اضافه می‌گردد (Scialdone, 2006). تحقیقات نشان داده است که برای تهیه فرمولاسیون EC از عصاره گیاهان، خاصیت امولسیون کنندگی Tween-85 بهتر از span-85 می‌باشد (حیدری علیزاده و همکاران، ۱۳۸۷).

نتایج این تحقیق نشان داد که میزان ۱۵ درصدی فرمولاسیون EC عصاره اوکالیپتوس در شرایط گلخانه با قارچ‌کش مانکوزب (۲/۰٪) از نظر میزان کنترل بیماری لکه مویی سیب‌زمینی برابری نموده و با آن اختلاف معنی‌داری نداشت. در تحقیقات دیگر نیز آن‌ها نشان داده شده است که عصاره و یا فرمولاسیون اوکالیپتوس دارای خاصیت قارچ‌کشی علیه بسیاری از عوامل بیمارگر قارچی می‌باشند. برای مثال ابوالسعود و همکاران (۲۰۰۵) در مصر، پس از تهیه فرمولاسیون اسانس‌های روغنی شش گیاه از جمله اوکالیپتوس نتیجه‌گیری نمودند که فرمولاسیون اوکالیپتوس یکی از قارچ‌کش‌های موثری بود که توانست رشد کلنی قارچ‌های بیماری‌زای متعددی از جمله *A. alternata* را متوقف نماید (Abo-El-Seoud *et al.*, 2005). همچنین هور و همکاران (۲۰۰۰) نشان دادند که عصاره متانولی سه گونه اوکالیپتوس به ترتیب روی بیست و شش گونه قارچ و باکتری بیمارگر مورد آزمایش فعالیت ضد میکروبی دارد. تحقیقات ذاکر و مصلی‌نژاد (۲۰۱۰) نشان داد که عصاره متانولی اوکالیپتوس از بین عصاره‌های پنج گیاه مختلف دارای توانایی قابل قبولی در جلوگیری از رشد پرگنه و همچنین جوانه‌زنی اسپور گونه غالب عامل بیماری لکه آلترناریایی سیب‌زمینی (*A. alternata*) در استان سمنان بوده است (Zaker and Mosalanejad, 2010).

تحقیقات نشان داده است که عصاره‌های استخراج شده با حلال‌های شیمیایی خالص از قبیل اتانول، متانول، هگزان و استن در مقایسه با آب و حلال‌های رقیق شده اثر قارچ‌کشی بیش‌تری از خود نشان می‌دهند به همین دلیل برای تهیه فرمولاسیون EC اوکالیپتوس در تحقیق حاضر از استن خالص استفاده شد. در این رابطه شیرزادیان و همکاران (۱۳۸۸) عصاره ۲۳ گیاه را با استفاده از حلال‌هایی مانند اتانول، متانول، استون و آب استخراج نموده و تأثیر آن‌ها را روی تعدادی از عوامل بیماری‌زای قارچی از جمله *A. alternata* بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که عصاره‌های اتانولی شش گونه خزه و دو گونه جگرواش در مقایسه با عصاره‌های آبی آن‌ها از تأثیر قارچ‌کشی بسیار بالاتری علیه این قارچ برخوردار بودند. همچنین هسینین و همکاران (۲۰۰۸) که اثر قارچ‌کشی عصاره‌های چریش و گیلاس چینی (China cherry) استخراج شده با حلال‌های اتانول، اتیل استات و آب را مورد بررسی قرار دادند به این نتیجه رسیدند که اثر قارچ‌کشی محلول ۲۰ درصدی عصاره اتانولی و اتیل استات چریش بهتر از نسبت

مشابه آبی این عصاره در کنترل قارچ‌های *F. oxysporum* و *A. solani* بوده است (Hassanein et al., 2008). در بررسی ذاکر و مصلی‌نژاد (۲۰۱۰) نیز خاصیت قارچ‌کشی عصاره‌های متانولی بیش‌تر از عصاره‌هایی بود که با رقیق نمودن نسبت ۱:۱ حلال و آب استخراج شده بودند. بنابراین با مقایسه تحقیقات حاصل از این بررسی با نتایج دیگر محققان می‌توان بیان نمود که فرمولاسیون EC عصاره متانولی اوکالیپتوس می‌تواند خاصیت قارچ‌کشی مناسبی داشته باشد. هدف از انجام این تحقیق شناسایی قارچ‌کشی کم‌خطر در مقایسه با قارچ‌کش‌های شیمیایی معمول برای کنترل بیماری لکه موجهی سیب‌زمینی بوده است.

در این مطالعه مشخص گردید که فرمولاسیون EC عصاره اوکالیپتوس دارای خاصیت قارچ‌کشی علیه قارچ *A. alternata* در شرایط گلخانه می‌باشد، ولی با توجه به اینکه با افزایش نسبت فرمولاسیون اوکالیپتوس بر شدت گیاه‌سوزی آن افزوده گردید، به نظر می‌رسد که بتوان با برطرف نمودن این نقیصه از آن به عنوان قارچ‌کشی کم‌خطر و جایگزین با قارچ‌کش‌های شیمیایی برای کنترل بیماری لکه موجهی سیب‌زمینی استفاده نمود.

References

منابع

- احمدی، ک.، قلی‌زاده، ح.، عبادزاده، ح.، حسین‌پور، ر.، حاتمی، ف.، عبدشاه، ه.، رضایی، م. م.، کاظمی‌فرد، ر. و فضلی استبرق، م. ۱۳۹۴. آمارنامه سال ۹۳. جلد سوم. محصولات باغبانی. وزارت جهاد کشاورزی. معاونت برنامه‌ریزی و اقتصادی. مرکز فناوری اطلاعات و ارتباطات. ۱۴۷ صفحه.
- امتی، ف. و کریمی روزبهانی، ع. ر. ۱۳۸۱. بررسی بیماری‌های قارچی سیب‌زمینی در استان سمنان. ضمیمه خلاصه مقالات پانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. کرمانشاه. ص: ۳۴.
- حیدری علیزاده، ب.، تاجبخش، م. ر.، جباری، ل.، افضل، م.، نقوی، م. ح.، شوری، ن.، حیدری، الف. و مروتی، م. ۱۳۸۷. بررسی امکان تهیه فرمولاسیون‌های (EC Emulsifiable Concentrates) چریش. انتشارات موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور. شماره ثبت در سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (۸۸/۸/۲۳-۸۸/۸۶۸). ۳۹ صفحه.
- شیرزادیان، س.، افشاری‌آزاد، ه. و خلقانی، ج. ۱۳۸۸. بررسی مقدماتی تاثیرات ضد قارچی عصاره بریوفیت‌ها. نشریه آفات و بیماری‌های گیاهی. ۷۷(۲): ۱ - ۲.
- Abdel-Raouf, M. K. 2001.** Phytofungitoxic properties in the aqueous extracts of some plants. Pakistan Journal of Biological Sciences 4 (4): 392-394.
- Abo-El Seoud, M. A., Sarhan, M. M., Omar, A. E. and Helal, M. M. 2005.** Biosides formulation of essential oils having antimicrobial activity. Archives of phytopathology and plant protection 38: 175-184.
- Dawar, S., Younus, S. M., Tariq, M. and Zaki, J. 2007.** Use of *Eucalyptus* sp. in the control of root infecting fungi on mung bean and chick-pea. Pakistan Journal of Botany 39(3): 975-979.
- Droby, S. and Prosky, D. 1984.** *Alternaria alternata*: A new pathogen on stored potatoes. Plant Disease 68: 160-161.
- Erikson C, 2007.** Extraction process. US Patent No: 2007/0128236.
- Fawcett, C. H. and Spencer, D. M. 1966.** Antifungal phenolic acids in apple fruits after infection with *Sclerotinia fructigena*. Annals of Applied Biology 60: 87-96.
- Gilchrist, D. G. and Grogan. R. C. 1975.** Production and nature of host specific toxin from *Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici*. Phytopathology 66:165-171.
- Hassanein, N. M., Abou-Zaid, M. A., Youssef, K. A. and Mahmood, D. A. 2008.** Efficacy of leaf extracts of Neem (*Azadirachta indica*) and Chinaberry (*Melia azedarach*) against early blight and wilt diseases of tomato. Australian Journal of basic and applied sciences 2(3): 763-72.
- Hur, J. S., Ahn, S. Y., Koh, Y. J. and Lee, C. 2000.** Antimicrobial properties of cold tolerant *Eucalyptus* species against phytopathogenic fungi and food borne bacterial pathogens. plant Pathology Journal 16(5): 286-289.
- James, C. 1971.** A manual of assessment keys for plant diseases. APS press. American Phytopathological Society USA. 88 pp.

- Janousek, C. N., Lorber, J. D. and Gubler, W.D. 2009.** Combination and rotation of bacterial antagonists to control powdery mildew on pumpkin *Journal of Plant Diseases and Protection* 116 (6): 260-262.
- Joseph, B., Dar, M. A. and Kumar, V. 2008.** Bioefficacy of plant extracts to control *Fusarium solani* f.sp. *melongenae* incitant of brinjal wilt. *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry* 3(2): 56-59.
- Rotem, J. 1994.** The genus *Alternaria*: biology, epidemiology and pathogenicity. APS press. American Phytopathological Society. Minnesota. USA 326 pp.
- Scialdone, M.A. 2006.** Formulations containing insect repellent compounds. US Patent No: 20060223878-A1.
- Simmons, E.G. 2007.** *Alternaria*: An Identification Manual. APS press. American phytopathological society. Minnesota. USA. 775 pp.
- Stevenson, W. R., Loria, R., Franc, G. D. and Weingartner, D. P. 2001.** Compendium of Potato Diseases, 2nd ed. APS press. American Phytopathological Society. Minnesota. USA. 144 pp.
- Thejavathi, R., Shirish, R., Yakkundi, B. and Ravindranath, B. 1995.** Determination of azadirachtin by reversed-phased high-performance liquid chromatography using anisole as internal standard. *Journal of chromatography* 705: 374-379.
- Wilson, C. L., Solar, J. M., Ghaouth, A. E. L. and Wisniewski, M. E. 1997.** Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant Disease* 81(2): 204-210.
- Yamazaki, R. B., Klocke, A. J., Lee, M. S., Stone, A. G. and Darlington, V. M. 1986.** Isolation and purification of azadirachtin from neem (*Azadirachta indica*) seeds using flash chromatography and high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 356: 220-226.
- Zaker, M. and Mosallanejad, H. 2010.** Antifungal activity of some plant extracts on *Alternaria alternata*, the causal agent of Alternaria leaf spot of potato. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 13(21): 1023-1029.